

研 究 報 告 書

「シナプス強度を決定する基本原理の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：深田 優子

1. 研究のねらい

脳の神経細胞間のシナプス伝達の強さ(シナプス強度)は常に一定ではなく、外界刺激に応答して変化する。この柔軟な変化によって脳は記憶・学習・情動など重要な機能を果たし、また、このメカニズムが破綻するとてんかんや認知症など脳機能の異常が生じる。高次脳機能を理解するためには、シナプス強度を決定する基本原理を明らかにする事が必要不可欠である。脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司るAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)は神経活動に応じてその活性(質)とシナプス発現(量)が時間・空間的に制御され、シナプス強度を規定している。したがって、AMPA受容体機能を制御する分子機構の解明は現在の脳科学の最重要課題の一つと考えられている。これまでに多くの研究者によりAMPA受容体の制御機構の解明が試みられてきたが未だ全容解明には至っていない。申請者はAMPA受容体に関連した脳内蛋白質複合体を精製することにより、AMPA受容体機能を特異的に促進する新規のリガンド・受容体LGI1/ADAM22を同定した(Fukata Y et al, Science 2006)。LGI1、ADAM22 いずれの変異もシナプス伝達の異常が原因と考えられるてんかん発作を引き起こすことから、LGI1 のシナプス伝達制御における重要性は遺伝学的にも強く支持されている。本研究では新規神経伝達修飾分子LGI1に焦点を当てAMPA受容体の制御機構を明らかにすることにより、シナプス強度を決定する基本原理を解明することを目指す。具体的には、1)LGI1の作用機構、2)LGI1の分泌制御機構、3)LGI1の個体レベルでの生理機能、4)LGIファミリーの機能多様性を明らかにし、新規神経伝達修飾分子LGI1によるシナプス強度の決定機構を統合的に明らかにする。

2. 研究成果

1)LGI1の作用機構と個体レベルでの生理機能

本研究では私は遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせ、LGI1 遺伝子欠損マウスの表現型とLGI1 が組織する蛋白質ネットワークを解析した。まず、私はLGI1 遺伝子欠損マウスを作成し、全てのホモ接合型マウス(LGI1 KOマウス)が生後2～3週の間には致死性のてんかん発作を呈することを見出した。この表現型はLGI1の受容体と考えられていたADAM22の遺伝子欠損マウスで報告されているものと酷似していた。Thy1プロモーターを用いて神経細胞特異的にLGI1遺伝子を発現させる回復実験により、LGI1遺伝子欠損マウスのてんかん表現型は完全にレスキューされた。一方、LGIファミリーの他メンバーでADAM22結合活性がないLGI3の発現ではてんかん発症の抑止効果は認められなかった。すなわち、この表現型はLGI1 単一遺伝子の欠失による特異性の高いものであることを示した。さらに、ヘテロ接合型マウス(LGI1 発現が半量)においては自発的なてんかん発作は見られないものの、けいれん誘発への感受性が有意に上昇していた。このように本結果は、LGI1 変異が見出されたヒトの家族性部分てんかんが、LGI1の機能欠損(ハプロ不全)によっておこることを明確に示した(Y. Fukata et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010)。

次に、上述の機能回復実験に用いたLGI1 トランスジェニックマウスを用い、TAP(Tandem Affinity Purification)法によりLGI1の脳内作用点を探索した。ADAM22とその類縁タンパク質ADAM23がLGI1の脳内の主要な作用点(受容体)であることが分かった(図1)。ADAM23欠損マウスもLGI1やADAM22欠損マウスと酷似した致死性のてんかん発作がおこることが報告されている。したがって、LGI1、ADAM22とADAM23は遺伝学的に共通経路上で機能していることが強く示唆された。実際、ADAM22とADAM23はLGI1を介して一つの複合体として存在していた。LGI1 KOマウスではシナプス画分のADAM22、ADAM23が激減し、ADAM22と

ADAM23 間の結合が消失していた。さらに海馬において、ADAM22、ADAM23 および Kv1 の分子層からの脱局在が観察され、電気生理学的にも AMPA 受容体を介したシナプス伝達の低下が認められた。このように、LGI1、ADAM22、ADAM23 からなるリガンド・受容体複合体は脳の興奮性を制御する重要な相互作用であり、正常脳ではてんかん発症を抑制する‘抗てんかん原性’複合体として機能していると考えられた(図2、Y. Fukata et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010)。本研究で作成したLGI1 遺伝子欠損マウスはヒトのてんかんモデルマウスとしても有用と考えられる。

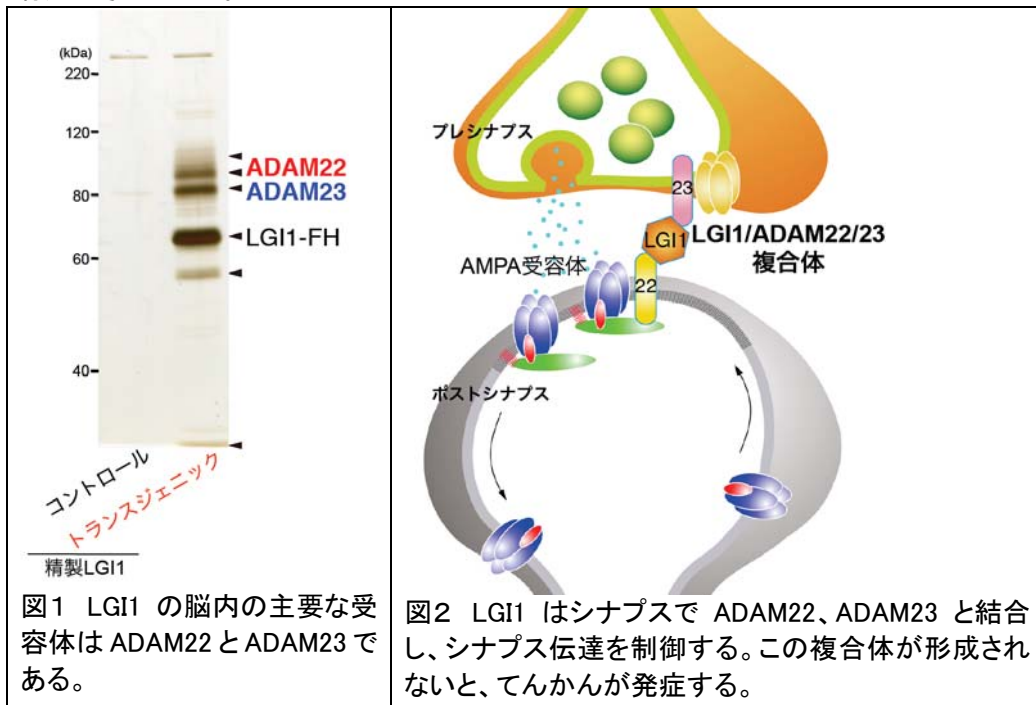


図1 LGI1 の脳内の主要な受容体は ADAM22 と ADAM23 である。

図2 LGI1 はシナプスで ADAM22、ADAM23 と結合し、シナプス伝達を制御する。この複合体が形成されないと、てんかんが発症する。

2) LGI1・ADAM 複合体の脳内作用の分子基盤とてんかん発症との関連

上記結果を受けて生じた新たな疑問「LGI1 欠損により AMPA 受容体による興奮性シナプス伝達が低下するにも関わらず、なぜ神経回路の過剰興奮状態であるてんかんが生じるのか」の解明に取り組んだ。まず、「LGI1 欠損により興奮性神経と抑制性神経がつくる複雑なネットワーク内に不均衡が生じている」可能性を考え、てんかん発症における責任神経回路を同定する実験系を構築した。上記の Thy1 プロモーターを用いた LGI1 機能回復実験を応用し、脳の神経回路を構成する神経細胞「種」特異的に、LGI1 遺伝子を発現させるためのマウスシステムを作成した。また、LGI1 遺伝子欠損マウスの生化学的、組織化学的、電気生理学的な表現型解析をさらに進め、これまでに、LGI1・ADAM リガンド・受容体の機能低下が、とくに海馬特定領域の AMPA 受容体機能低下を引き起こし、これが直接、海馬の異常興奮を惹起し、てんかんの原因となることを示唆する結果を得た(未発表)。

3. 今後の展開

進行中の神経細胞種特異的な LGI1 機能回復実験により、てんかん発症に関わる局所神経回路を決定する。てんかん病態における興奮性シナプス伝達異常という新しい側面が明らかになることが期待される。また、ヒト家族性てんかんで報告されている LGI1 変異体の性状解析により LGI1 の分子機能、作用機構を詳細に明らかにする。作成される LGI1 遺伝子変異マウスはてんかんモデルマウスとしても有用と考えられる。また、LGI1 のシナプス可塑性における役割を検討し、シナプス強度制御機構の原理と病態の全容を解明する。

4. 自己評価

さがけ研究により、LGI1 の作用機構の根幹となる分子経路および LGI1 の個体レベルの

生理機能を明らかにすることができた。この結果、LGI1・ADAMリガンド・受容体複合体は、脳の興奮性を制御するシステムを構築しており、正常脳ではてんかん発生を抑制する‘抗てんかん原性’複合体として機能していることを提唱した。この結果をもとに、現在神経回路レベルのLGI1機能を解析しており、生化学的手法を基盤とした分子レベルの研究を神経回路機能研究にまで発展させることができた。当初の研究計画をほぼすべて遂行し、本分野で主導的に研究を進めることができた。また本研究を通じて、国内外の共同研究を立ち上げ、新しい研究手法を取り入れることができた。一方で、LGI1・ADAMがAMPA受容体以外の分子経路を介して、シナプス伝達や脳の興奮性を制御する可能性も残っており、今後はLGI1と高次脳機能の間をつなぐミッシングファクターを確実に明らかにしていきたい。

5. 研究総括の見解

グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス伝達に関わる分子として同定したLGI1の生理機能を解析し、着実に成果を発展させている。なお多くが不明であるてんかんの発症機序の解明に挑戦し続け、基本機構を明らかにすることを期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表: 主なものを抜粋。

1. <u>Fukata Y</u> , Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M (2010) Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. Proc Natl Acad Sci U S A 107:3799-3804
2. <u>Noritake J</u> , <u>Fukata Y</u> , Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht DS, Hamakubo T, Fukata M (2009) Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. J Cell Biol 186:147-160
3. <u>Tsutsumi R</u> , <u>Fukata Y</u> , <u>Noritake J</u> , Iwanaga T, Perez F, Fukata M (2009) Identification of G-protein alpha subunit palmitoylating enzyme. Mol Cell Biol 29:435-447

(2) 特許出願

該当なし。

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

・ Fukata Y “Role of the novel epilepsy-related protein network in synaptic transmission.” Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation (Kobe, Japan) (2009/11/11-11/12)

学会発表

・ Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Yokoi N, Nicoll RA, Fukata M “Possible involvement of epilepsy-related ligand/receptors, LGI1/ADAM22/ADAM23 in trans-synaptic interaction. “Gordon Research Conferences-Cell Biology of the Neuron- (Waterville Valley, NH) (2010/6/27-7/2)

・ Fukata Y, Fukata M.”In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1.”11th International Neurochemistry Winter Conference (Solden, Austria) (2009/3/31-4/4)

・ Fukata Y, Watanabe, A, Iwanaga, T, Fukata, M. “In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1.”36th International Congress of Physiological Sciences (Kyoto, Japan) (2009/7/27-8/1)

・ Fukata Y, Watanabe A, Iwanaga T, Fukata M “Physiological role of epilepsy-related ligand LGI1 in synaptic function.” The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Francisco, CA) (2008/12)

受賞

・平成 21 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 “蛋白質複合体解析による高次細胞機能の制御機構の研究” (2009/4/14)

著作物等

・ Fukata Y, Fukata M ”Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. “Nat Rev Neurosci 11:161-175 (2010)

・ 岩永剛、深田正紀、深田優子 「LGI1 が仲介するタンパク質複合体の破綻はシナプス伝達異常とてんかんを引き起こす」細胞工学VOL. 29, No.6, pp594-595:学研メディカル秀潤社(2010)

・ 横井紀彦、深田正紀、深田優子「シナプス伝達修飾分子LGI1 の機能異常による“てんかん”発症」Medical Bio VOL. 7, pp40-47:オーム社(2010)

・ プレスリリース「てんかん発症防ぐ蛋白質特定」毎日新聞(平成 22.1.26 朝刊 2 面)、日本経済新聞 (H22.1.26 夕刊)他

・ プレスリリース「脳の働きを正常に保つ2つの酵素の働き解明」科学新聞(平成 21.7.24 日 1 面)他